

(19) RÉPUBLIQUE FRANÇAISE  
—  
INSTITUT NATIONAL  
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE  
—  
PARIS  
—

(11) N° de publication : **2 739 860**

(à n'utiliser que pour les  
commandes de reproduction)

(21) N° d'enregistrement national : **95 12137**

(51) Int Cl<sup>6</sup> : **C 07 K 14/415, A 61 K 7/48**

(12)

## BREVET D'INVENTION

**B1**

(54) COMPLEXES AMPHIPHILES, PROCEDE POUR LEUR PREPARATION ET COMPOSITIONS EN RENFERMANT

(22) Date de dépôt : 17.10.95.

(30) Priorité :

(60) Références à d'autres documents nationaux apparentés :

(71) Demandeur(s) : *COLETICA SOCIETE ANONYME — FR.*

(43) Date de la mise à disposition du public de la demande : 18.04.97 Bulletin 97/16.

(45) Date de la mise à disposition du public du brevet d'invention : 02.01.98 Bulletin 98/01.

(72) Inventeur(s) : *PERRIER ERIC, HUC ALAIN, ANTONI DANIELE, ROUSSEL CORALIE, PINA MICHEL et GRAILLE JEAN.*

(56) Liste des documents cités dans le rapport de recherche :

*Se reporter à la fin du présent fascicule*

(73) Titulaire(s) :

(74) Mandataire(s) : *CABINET BEAU DE LOMENIE.*

FR 2 739 860 - B1



La présente invention a pour premier objet des complexes amphiphiles (hydrolipidiques) et plus précisément des protéines et polypeptides sur lesquels ont  
5 été greffées des chaînes grasses. On peut qualifier lesdits complexes de protéines et polypeptides lipophilisés. La présente invention a également pour objets des compositions notamment cosmétiques, pharmaceutiques ou alimentaires renfermant de tels complexes et des procédés pour la préparation desdits complexes.

10 La peau peut être considérée comme un organe qui sépare et protège le corps humain de son environnement. Cet effet de barrière contre les agressions extérieures est capital pour que les tissus internes puissent exercer convenablement leur fonction. Les agressions extérieures sont en effet multiples : agressions lumineuses (UVA, UVB, infra-rouges) qui provoquent radicaux libres et  
15 fragmentation des constituants de la peau, agressions physiques ou mécaniques (frottements, variations de température et d'hygrométrie ...) qui provoquent des inflammations, agressions chimiques (pollution de l'air, de l'eau, contact avec des éléments irritants ou immunogènes), agressions microbiologiques (bactéries, virus, champignons ...). Afin de réagir à ces différentes agressions, la peau dispose d'un  
20 certain nombre de cellules spécialisées, formant parfois des structures extrêmement bien caractérisées. C'est le cas des cornéocytes qui, différenciés à partir des kératinocytes, forment une structure appelée Stratum corneum, qui est spécialisée dans la protection des zones plus internes de la peau. Cette structure cornée superficielle est la première protection vis-à-vis des agressions extérieures.

25 L'utilisation de produits cosmétiques et notamment de produits d'hydratation se heurte également à cette barrière naturelle :

– de par leur petite taille, des molécules hydrophiles de petite masse moléculaire comme l'urée, l'acide lactique, les acides aminés, peuvent pénétrer via le Stratum corneum, jusque dans des couches plus profondes des tissus cutanés.  
30 L'effet cosmétique obtenu est un effet hydratant des couches profondes de l'épiderme et du derme, effet généralement relativement court;

– par contre, des molécules de plus haute masse moléculaire comme les protéines par exemple ne peuvent pas franchir cette barrière. En effet, le Stratum corneum est principalement constitué de lipides (sa teneur en lipides est  
35 proche de 80 % en poids), ce qui lui donne un caractère particulièrement hydrophobe, totalement incompatible avec le caractère hydrophile de la plupart des

protéines utilisées dans le domaine cosmétologique. Dans ce cas, l'effet cosmétique obtenu est un effet filmogène, parfois intéressant pour l'obtention de textures ou de "touchers cosmétiques" particuliers, mais qui reste totalement et exclusivement superficiel.

5                   Ainsi, et par voie de conséquence, les molécules hydrophiles utilisées à ce jour en cosmétique sont repoussées par cette structure hydrophobe et soit restent en surface soit pénètrent très profondément dans le derme. De ce fait, la couche cornée et les couches supérieures de l'épiderme ne subissent pratiquement aucune influence des substances actives et notamment hydratantes utilisées à ce jour en  
10 cosmétique. Or, l'impression de sécheresse de la peau provient du Stratum corneum et des couches supérieures de l'épiderme. Il est donc capital de parvenir à hydrater efficacement cette structure et plus généralement de rendre accessible à diverses entités hydrophiles ladite structure.

                  La Demanderesse, dans le cadre de la présente invention, a abordé ce  
15 problème technique de l'hydratation de la peau et plus généralement celui de l'optimisation de l'expression de l'activité de molécules du type protéine ou polypeptide au niveau du Stratum corneum. Pour résoudre ledit problème technique, elle propose de modifier le caractère physico-chimique desdites molécules et d'en modifier ainsi le comportement. Elle propose en fait de générer  
20 des complexes amphiphiles en greffant des chaînes grasses sur lesdites molécules. Les pénétrations trans-épidermiques de tels complexes sont différentes de celles des molécules non complexées. Leur stabilisation dans les couches supérieures de l'épiderme ainsi que sur la fibre capillaire (cheveux) a été mise en évidence. Par ailleurs, on a observé, des propriétés cosmétiques voire thérapeutiques desdits  
25 complexes, fort intéressantes et inattendues.

                  Il a été décrit, dans la demande de brevet FR-A-2 671 725 des complexes polyoses-acides gras qui présentent des propriétés hydratantes et émulsionnantes. Ces complexes sont obtenus en faisant réagir, en milieu aqueux, à la température ambiante, des acides gras sous forme réactive avec des polyoses.  
30 Lesdits polyoses peuvent intervenir sous forme impure et notamment en mélange avec des protéines. Toutefois, dans ce document, il n'est fait aucune mention d'un complexe "binaire" protéine-acide gras et des quelconques propriétés intéressantes qu'il pourrait présenter ... En tout état de cause, les polysaccharides (polyoses) présentant un pouvoir gélifiant bien supérieur à celui des protéines, on ne pouvait  
35 s'attendre à obtenir des complexes hydratants et émulsionnants en lipophilisant de

telles protéines. Tel est pourtant l'un des résultats obtenus dans le cadre de la présente invention ...

Il a également été décrit, dans le brevet US-A-4,234,475 un procédé de préparation d'émulsionnants qui consiste à faire réagir, à des températures  
5 supérieures à 200 °C, une protéine et un acide, notamment un acide gras. A de telles températures, on ne peut éviter la dégradation de chacun des réactifs, et notamment celle de la protéine (dénaturée ou hydrolysée en peptides), dont les propriétés sont en conséquence inéluctablement altérées.

Enfin, il a été décrit dans la demande WO-A-93 22370 des dérivés de  
10 l'acide undécylénique obtenus en faisant réagir ledit acide, sous forme réactive, en milieu aqueux, à la température ambiante, avec une macromolécule organique hydrophile possédant des groupements alcools primaires et/ou amines primaires et notamment avec une protéine. Lesdits dérivés, très faiblement odorants, ont conservé des propriétés anti-fongique et anti-bactérienne. On a surtout cherché,  
15 par leur biais, à optimiser l'expression des activités de l'acide undécylénique.

La Demanderesse propose présentement de nouveaux complexes amphiphiles ou hydrolipidiques – complexes protéine(s) et/ou polypeptide(s)/ chaîne(s) grasse(s) – qui, comme indiqué ci-dessus, présentent des propriétés cosmétiques voire thérapeutiques fort intéressantes et relativement inattendues.

20 Lesdits complexes de l'invention sont, de façon caractéristique, obtenus à l'issue de la réaction, mise en oeuvre à une température comprise entre la température ambiante et 80°C, entre :

– d'une part, une (ou plusieurs) protéine(s) et/ou un (ou plusieurs) polypeptide(s), dont la masse moléculaire moyenne est supérieure à 2 000 Daltons;  
25 et

– d'autre part, une (ou plusieurs) chaîne(s) grasse(s), dont le nombre de carbone est compris entre 4 et 30, choisie(s) parmi les acides gras, les alcools gras, les amines grasses et leurs dérivés, à l'exclusion de l'acide undécylénique.

La réaction mise en jeu pour le couplage et/ou greffage des réactifs  
30 peut être de type chimique ou enzymatique. Ceci sera précisé plus avant dans le présent texte. En tout état de cause, elle est mise en oeuvre à une température bien inférieure à 200°C, inférieure à 100°C. On souhaite minimiser voire éviter toute dégradation des réactifs et notamment des protéine(s) et/ou polypeptide(s) intervenants.

35 Ladite réaction est mise en oeuvre avec deux types de réactifs : d'une part, les protéine(s) et/ou polypeptide(s), d'autre part les chaînes grasses. Lesdites

chaînes grasses consistent aussi bien en des acides gras que des alcools gras ou amines grasses (ou en les dérivés desdits acides, alcools et amines).

On peut d'ores et déjà insister sur la multiplicité et la variété des complexes de l'invention et donc des propriétés qu'ils sont susceptibles de  
5 présenter; ces dernières dépendant de la nature des réactifs (protéine(s) et/ou polypeptide(s) et chaîne(s) grasse(s)) intervenants et de leurs caractéristiques intrinsèques (par exemple, nature de la protéine intervenant, pureté de celle-ci, poids moléculaire de celle-ci).

On précise ci-après, chacun des deux types de réactifs.

10 Les complexes de l'invention sont des complexes de protéines et/ou de polypeptides et de chaînes grasses. Sont exclus du cadre de ladite invention les complexes obtenus à partir d'acides aminés, que ceux-ci soient purifiés ou obtenus en mélange lors de l'hydrolyse d'une protéine ainsi que les complexes obtenus à partir de peptides ne renfermant que 2 à 5 acides aminés dans leur structure. Les  
15 protéines et polypeptides susceptibles d'intervenir dans la structure des complexes de l'invention ont une masse moléculaire moyenne égale ou supérieure à 2 000 Daltons. Ils consistent en un enchaînement, d'acides aminés liés entre eux par des liaisons amides, qui présente des fonctions amines et/ou acides et/ou alcools pendantes.

20 Généralement, leur masse moléculaire moyenne est inférieure à 1 000 000 Daltons. il n'est toutefois nullement exclu de préparer des complexes de l'invention avec des protéines d'une masse moléculaire supérieure. Avantageusement, les complexes de l'invention sont préparés à partir de protéines ou polypeptides, dont la masse moléculaire moyenne est comprise entre 5 000 et  
25 300 000 Daltons.

En tout état de cause, les protéines et polypeptides intervenants peuvent être obtenus par une extraction ne détruisant pas leur structure et/ou ne diminuant pas leur masse moléculaire ou par hydrolyse physique, chimique ou enzymatique modérée d'entités de masse moléculaire plus élevée (ladite hydrolyse  
30 générant des protéines et/ou polypeptides dont la masse moléculaire moyenne est au moins égale à 2 000 Daltons).

Lesdites protéines ou lesdits polypeptides intervenants peuvent être issus d'animaux (bovins, ovins, poissons, requin, crustacés ...) et dans ce cas, ils peuvent être extraits de différents tissus; citons par exemple le collagène, la  
35 gélatine, l'albumine, l'ovalbumine, l'élastine, la réticuline, la fibronectine, la kératine, la soie, la laminine, la desmosine et l'isodesmosine, les protéoglycannes

de la matrice extracellulaire, les caséines, la lactalbumine, les lactoglobulines, les enzymes extraites de tissus animaux, etc ... Ils peuvent être issus de plantes (blé, algues unicellulaires ou multicellulaires, maïs, pois, lupin ...) et dans ce cas, ils peuvent être extraits de graines, de fleurs, de fruits, d'écorces, de gommes, etc ... ;

5 citons pour exemple les protéines ou hydrolysats modérés de blé, de maïs, de coton, de lupin, de pois, de fève, d'amande, de féverole, de soja, de tournesol, de luzerne, d'avoine, etc ...

On prépare avantageusement des complexes de l'invention avec des protéines de soja, de blé, d'avoine ou des polypeptides d'amande.

10 On notera ici que, dans la suite du présent texte, on pourra incidemment utiliser le terme protéine pour désigner aussi bien une "réelle" protéine qu'un polypeptide (obtenu éventuellement par synthèse).

Pour ce qui concerne le deuxième type de réactifs, il s'agit comme déjà précisé, de chaînes grasses comportant de 4 à 30 atomes de carbone.

15 Avantageusement, les chaînes grasses intervenantes comportent de 6 à 20 atomes de carbone. Elles peuvent être saturées ou insaturées, linéaires, branchées ou cycliques. Elles présentent évidemment des fonctions acide et/ou alcool et/ou amine mais il n'est nullement exclu qu'elles présentent d'autres fonctions chimiques dans leur structure qui interviennent ou n'interviennent pas dans la

20 préparation des complexes de l'invention.

Lesdites chaînes grasses peuvent notamment être choisies parmi les acides gras heptanoïque, octanoïque, décanoïque, laurique, myristique, palmitique, stéarique, ricinoléique, oléique, linoléique, linolénique; les alcools gras et amines grasses correspondants; les dérivés desdits acides gras, alcools gras et amines

25 grasses ; et leurs mélanges.

On prépare avantageusement des complexes de l'invention :

– avec les acides laurique, stéarique ou palmitique et notamment les acides stéarique et palmitique en mélange;

– avec de la laurylamine ou de l'hexadécylamine;

30 – avec du décylalcool.

On a vu que lesdites chaînes grasses consistent en des acides gras, des alcools gras ou des amines grasses (ou leurs dérivés). Pour la préparation des complexes de l'invention par voie chimique, lesdits acides gras interviennent sous des formes réactives (plus réactives), et notamment sous la forme d'halogénures

35 (chlorures, bromures, iodures ...), d'anhydrides ou de dérivés d'anhydrides.

Au sein de la structure des complexes de l'invention, le rapport pondéral [protéine et/ou polypeptide]/[chaîne(s) grasse(s)] peut varier généralement de 1/1 à 1/10 et préférentiellement de 1/3 à 1/5.

On fait, en fait, réagir la (les) protéine(s) et/ou le (les) polypeptide(s)  
5 avec un excès plus ou moins large de chaînes grasse(s) dans le but de créer des liaisons covalentes mais aussi des liaisons de type ionique, hydrogène, Van der Waals.

Par ailleurs, généralement, à l'issue de la réaction, on ne récupère pas les chaînes grasses qui n'ont pas réagi, qui ne sont pas liées à la protéine et/ou au polypeptide; on ne cherche pas à isoler des complexes "binaires" du type :  
10 protéine(s)-chaînes grasses, polypeptide(s)-chaînes grasses ou protéine(s), polypeptide(s)-chaînes grasses, purs. Ainsi, les complexes de l'invention consistent-ils généralement en des complexes "binaires" du type indiqué ci-dessus en mélange avec des chaînes grasses non liées.

15 Lesdits complexes constituent le premier objet de la présente invention. Les compositions, notamment cosmétiques, pharmaceutiques ou alimentaires, en renfermant constituent le second objet de ladite invention.

Lesdites compositions renferment généralement de 0,01 à 40 % en poids de tel(s) complexe(s) et avantageusement de 0,1 à 10 % en poids.

20 Plus précisément, font partie intégrante de la présente invention, les compositions notamment cosmétiques, pharmaceutiques ou alimentaires qui renferment, à titre d'ingrédient actif, au moins une protéine et/ou un polypeptide; ladite protéine et/ou ledit polypeptide intervenant, au moins en partie (voire en totalité) sous la forme d'un complexe tel que décrit ci-dessus. Pour l'élaboration  
25 desdites compositions on peut utiliser ledit complexe, purifié (isolé du milieu réactionnel dans lequel il a été synthétisé) ou en mélange avec l'un et/ou l'autre des réactifs qui sont intervenus dans sa synthèse. Selon cette seconde variante, on utilise avantageusement le milieu réactionnel (à l'issue de la réaction) renfermant ledit complexe et les réactifs n'ayant pas réagi (principalement des chaînes grasses  
30 dans la mesure où elles interviennent généralement en excès).

Font également partie de l'invention, les compositions où lesdits complexes interviennent à titre d'agents émulsionnants.

En tout état de cause, on a constaté, de manière surprenante, que les complexes de l'invention présentent des propriétés hydratantes et émulsionnantes.  
35 Ceci est relativement inattendu dans la mesure où l'homme du métier n'ignore pas que les protéines ont un pouvoir de piéger l'eau bien inférieur à celui des

polysaccharides et où ledit pouvoir, relativement faible dans l'absolu, aurait dû être affecté par la lipophilisation desdites protéines.

Outre ces propriétés hydratantes et émulsionnantes – relativement inattendues – les complexes de l'invention ont montré d'autres propriétés –  
5 totalement inattendues.

C'est ainsi qu'une protéine de blé soluble, possédant un poids moléculaire moyen de 100 000 Daltons, sur laquelle des chaînes d'acides stéarique et palmitique ont été greffées, présente des propriétés de restructuration cutanée extrêmement fortes, ce qui permet d'envisager l'utilisation de cette protéine  
10 lipophilisée (complexe au sens de l'invention) dans des applications où une destruction de l'épiderme est observée (agressions physico-chimiques ou vieillissement cutané ...).

De même, une protéine d'amande soluble, possédant un poids moléculaire moyen de 5 000 Daltons, sur laquelle des chaînes d'acides stéarique et  
15 palmitique ont été greffées, présente la propriété de calmer des érythèmes solaires modérés à forts, ce qui permet d'envisager l'utilisation de cette protéine lipophilisée (complexe au sens de l'invention) dans des formulations solaires ou après solaires.

De même, une protéine de laminaire insoluble, possédant un poids moléculaire moyen de 10 000 Daltons, sur laquelle des chaînes d'acide caprylique  
20 ont été greffées, présente la propriété d'inhiber un certain nombre de micro-organismes, ce qui permet d'envisager l'utilisation de cette protéine lipophilisée (complexe au sens de l'invention) dans des applications où la destruction des micro-organismes est envisagée (effets anti-acné, effets anti-pelliculaire, effets anti-odeurs corporelles, conservateur naturel ...).

On a précédemment insisté sur la diversité des complexes de l'invention. On saisit ici tout l'intérêt d'une telle diversité.

Par ailleurs, on rappelle ici que les propriétés des complexes de l'invention, qu'elles soient plus ou moins inattendues, s'expriment au niveau souhaité, au niveau du Stratum corneum, de par leur lipophilisation.

30 Les compositions de l'invention consistent donc essentiellement en des compositions cosmétiques. Il n'est pas exclu qu'ils s'agissent de compositions thérapeutiques, alimentaires ou diététiques particulièrement performantes au niveau des muqueuses.

Selon son troisième objet, l'invention concerne un procédé pour la  
35 préparation des complexes amphiphiles (hydrolipidiques) décrits ci-dessus. Ledit procédé comprend, de façon caractéristique, la réaction, à une température



comprise entre la température ambiante et 80 °C, si nécessaire en milieu aqueux ou solvant, entre au moins une protéine et/ou un polypeptide du type précité et au moins une chaîne grasse du type précité. Ladite réaction peut être qualifiée de réaction de greffage ou plus exactement de couplage (dans la mesure où elle ne  
5 génère pas seulement des liaisons covalentes entre les réactifs).

Ladite réaction est mise en oeuvre à relativement basse température. On minimise ainsi la dégradation des protéines et/ou polypeptides réactives. Elle fait intervenir ou non un solvant, milieu aqueux ou solvant organique. On peut se dispenser de l'intervention d'un tel solvant si, à la température de réaction les  
10 réactifs sont liquides.

A l'issue de la réaction, les complexes "binaires" ne sont généralement pas isolés. Ils se trouvent alors en mélange principalement avec des chaînes grasses qui n'ont pas réagi.

On souhaite généralement ajuster le pH des complexes obtenus, afin de  
15 le rendre compatible avec des applications, notamment cosmétiques, ultérieures. On l'ajuste à des valeurs comprises entre 2 et 10 et plus particulièrement comprises entre 5 et 7. A cette fin, on utilise des agents neutralisants choisis parmi :

- les bases minérales (telles KOH, NaOH,  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ ...);
- les bases métalliques (sous forme d'hydroxyde, de carbonate ...);
- 20 - les bases organiques (tampons citrates, phosphates, borates, acétates, TRIS ... ; amines ou alkylamines en  $\text{C}_1$ - $\text{C}_6$  : triéthanolamine, aminométhylpropane ...).

Après la réalisation des complexes dont les pH ont été ajustés à des pH compatibles avec leur utilisation ultérieure (ledit pH est avantageusement ajusté  
25 par dispersion desdits complexes en phase aqueuse) , il est possible de les sécher par atomisation, lyophilisation, déshydratation sous vide ... Lesdits complexes séchés, ou directement obtenus sans eau, peuvent être alors mis en forme, notamment sous la forme de copeaux.

La réaction de couplage mise en oeuvre peut être réalisée par voie  
30 chimique ou enzymatique. La voie enzymatique est, dans le contexte de la présente invention, totalement originale.

Selon ladite voie chimique, on peut :

- + faire réagir les chaînes grasses – acides gras, alcools gras, amines grasses – dans des conditions classiques de la synthèse peptidique; i.e. en présence  
35 d'agents bifonctionnels, tels des diimides;

+ faire réagir les acides gras sous des formes réactives (plus réactives), i.e. faire réagir des halogénures (chlorures, bromures, iodures ...) d'acides gras, des anhydrides d'acides gras, des dérivés d'anhydride d'acides gras ...

Selon ladite voie enzymatique, originale, on couple les protéines et/ou polypeptides aux chaînes grasses en présence d'une enzyme, généralement à une température comprise entre 30 et 70°C. Avantageusement ladite température est comprise entre 50 et 60°C. Avantageusement, l'enzyme intervenant est une acyltransférase. Selon trois variantes de cette voie enzymatique, ladite enzyme est une lipase, notamment choisie parmi les lipases de *Mucor miehei*, de pancréas de porc, de *Rhizopus arrhizus*, de *Candida*, de *Bacillus* et d'*Apergillus* ou une protéase, consistant notamment en la papaïne ou une amidase. Une telle réaction enzymatique assure, comme les réactions chimiques rappelées ci-dessus, le greffage de chaînes grasses sur les protéines et/ou polypeptides. Lesdites chaînes grasses, lorsqu'il s'agit d'acides gras, peuvent intervenir sous forme d'esters (y compris sous forme d'esters de glycérides). L'enzyme présente dans le milieu réactionnel assure, dans un premier temps, la trans-estérification.

La réaction mise en oeuvre, chimique ou enzymatique, assure le couplage en générant des liaisons covalentes esters et/ou amides. On a vu que ledit couplage fait également intervenir des liaisons ioniques, des liaisons hydrogènes, des liaisons de type Van der Waals...

La réaction est avantageusement mise en oeuvre avec une activité de l'eau du milieu réactionnel ( $a_w$ ) comprise entre 0,2 et 1 et avantageusement entre 0,3 et 0,7.

Les procédés de préparation des compositions de l'invention, compositions notamment cosmétiques, pharmaceutiques et alimentaires renfermant des complexes hydrolipidiques font également partie de l'invention. Ils consistent principalement à mélanger l'ingrédient actif à un excipient convenable. On a vu que ledit principe actif pouvait présenter des propriétés émulsionnantes. Ceci peut se révéler particulièrement intéressant. On peut ainsi limiter voire annuler l'intervention de tout agent émulsionnant synthétique.

L'invention est illustrée, sous ses différents aspects, par les exemples ci-après .

Tous les pourcentages indiqués sont des pourcentages en poids, sauf indication contraire.

**Exemple 1 :****Préparation d'un complexe protéine de soja-acide laurique (C12)**

1 660 g d'acide laurique, de pureté égale à 99 %, sont chauffés jusqu'à 60°C dans un réacteur sous azote. Après fusion des chaînes d'acide laurique et  
5 obtention d'une huile incolore, 470 g d'un isolat de soja commercial, contenant au minimum 96 % de protéines natives, sont alors ajoutés en pluie fine dans le réacteur sous agitation mécanique modérée.

Après obtention d'une suspension homogène, 300 g de lipase extraite à partir de *Mucor miehei*, immobilisée sur résine échangeuse d'anion macroporeuse  
10 (nom commercial : Lipozyme<sup>®</sup> de la société Novo) sont ajoutés au réacteur. L'ensemble est conservé 15 jours à 60°C dans un réacteur clos sous agitation mécanique modérée.

Après 15 jours de réaction, le complexe est filtré à 90°C afin d'éliminer l'enzyme. Le complexe ainsi obtenu est mis sous forme de copeaux lors de son  
15 refroidissement.

Après analyses, il s'avère que ce complexe est constitué de protéines lipophilisées dont environ 16 % des fonctions amines libres (latérales et terminales) ont été greffées par des acides gras (l'acide laurique).

Ce complexe se présente sous la forme d'une poudre de copeaux de  
20 couleur beige, d'odeur caractéristique. Il peut être utilisé dans une formulation cosmétique à 3 % et grâce à l'amphiphilicité apportée par le greffage, il est possible de l'incorporer dans les phases aqueuse et/ou huileuse d'une préparation cosmétique.

**25 Exemple 2 :****Préparation d'un complexe protéine de soja-acides stéarique (C18) et palmitique (C16)**

270 g d'acide stéarique et 180 g d'acide palmitique, chacun de pureté supérieure à 90 %, sont placés dans 1 000 ml de tertibutanol, puis chauffés jusqu'à  
30 60°C dans un réacteur sous azote. Après fusion des chaînes d'acides et obtention d'une huile incolore, 150 g d'un isolat de soja commercial, contenant au minimum 96 % de protéines natives, sont alors ajoutés en pluie fine dans le réacteur sous agitation mécanique modérée.

Après obtention d'une suspension homogène, 45 g de lipase extraite à  
35 partir de *Rhizopus arrhizus* sont ajoutés au réacteur. L'ensemble est conservé 21 jours à 55°C dans un réacteur clos sous agitation mécanique modérée.

Après 21 jours de réaction, le complexe est porté à 90°C pendant 20 min afin d'inactiver toute activité enzymatique résiduelle. Le tertibutanol est alors éliminé par distillation sous pression réduite. Le complexe ainsi obtenu est mis sous forme de copeaux lors de son refroidissement.

- 5           Après analyses, il s'avère que ce complexe est constitué de protéines lipophilisées dont environ 21 % des fonctions amines latérales ont été greffées par des acides gras.

10           Ce complexe se présente sous la forme d'une poudre de copeaux de couleur beige, d'odeur caractéristique. Il peut être utilisé dans une formulation cosmétique à 3 %, et grâce à l'amphiphilicité apportée par le greffage, il est possible de l'incorporer dans les phases aqueuse et/ou huileuse d'une préparation cosmétique.

**Exemple 3 :**

- 15    Préparation d'un complexe protéine de blé-acides stéarique (C18) et palmitique (C16)

20           On procède comme décrit à l'exemple 2 en substituant au 150 g de l'isolat de soja, 150 g d'un atomisat obtenu à partir d'une solution commerciale de protéine de blé (P.M = 100 000 D). On obtient un complexe du type de celui décrit à l'exemple 2 (copeaux de couleur beige, d'odeur caractéristique).

**Exemple 4 :**

**Préparation d'un complexe polypeptide d'amande-acides stéarique (C18) et palmitique (C16)**

- 25           300 g d'acide stéarique et 140 g d'acide palmitique, chacun de pureté supérieure à 90 %, sont placés dans 1 000 ml d'isopropanol, puis chauffés jusqu'à 60°C dans un réacteur sous azote. Après fusion des chaînes d'acides et obtention d'une phase huileuse homogène, 150 g d'un lyophilisat obtenu à partir d'une solution commerciale de polypeptide d'amande (P.M = 5 000 D), sont alors ajoutés  
30    en pluie fine dans le réacteur sous agitation mécanique modérée.

Après obtention d'une suspension homogène, 35 g de lipase extraite à partir de *Rhizopus arrhizus* sont ajoutés au réacteur. L'ensemble est conservé 12 jours à 55°C dans un réacteur clos sous agitation mécanique modérée.

- 35           Après 12 jours de réaction, le complexe est porté à 90°C pendant 20 min afin d'inactiver toute activité enzymatique résiduelle. L'isopropanol est

alors éliminé par distillation sous pression réduite. Le complexe ainsi obtenu est mis sous forme de copeaux lors de son refroidissement.

Ce complexe se présente sous la forme d'une poudre de copeaux de couleur beige, d'odeur caractéristique. Il peut être utilisé dans une formulation cosmétique à 3 %, et grâce à l'amphiphilicité apportée par le greffage, il est possible de l'incorporer dans les phases aqueuse et/ou huileuse d'une préparation cosmétique.

**Exemple 5 :**

On procède comme décrit aux exemples 2 à 4 mais le solvant intervenant est choisi parmi l'hexane, le chloroforme, le cyclohexane, le chlorométhane, le dichlorométhane, le trichlorométhane, l'éther éthylique, le méthyl-tertiobutyléther, ou un mélange de ces solvants.

**Exemple 6 :**

On procède comme décrit dans les exemples précédents mais en faisant varier la nature de l'enzyme utilisée : lipase de *Mucor miehei*, de pancréas de porc, de *Rhizopus arrhizus*, de *Candida*, de *Bacillus*, d'*Aspergillus* ou autres acyl-transférases.

**Exemple 7 :**

On procède comme décrit dans les exemples précédents mais en faisant varier la nature de la protéine intervenante : protéine de blé, d'avoine, de maïs, d'amande, de soja.

**Exemple 8 :**

On procède comme décrit dans les exemples précédents mais en faisant varier les paramètres de la réaction de couplage ci-après :

- la proportion entre chaînes grasses et protéines (ou polypeptides) ;
- la température de réaction (entre la température ambiante et 80°C) ;
- le temps de réaction (de 30 minutes à 21 jours).

**Exemple 9 :**

On procède comme décrit dans les exemples précédents mais en faisant varier la nature de l'acide gras intervenant : l'acide heptanoïque (C7), l'acide octanoïque (C8), l'acide décanoïque (C10), l'acide laurique (C12), l'acide

myristique (C14), l'acide palmitique (C16), l'acide stéarique (C18), l'acide ricinoléique (C18), l'acide oléique (C18), l'acide linoléique (C18), l'acide linolénique (C18), d'autres acides gras à chaînes plus courtes ou plus longues, saturés, insaturés ou polyinsaturés, utilisés purs ou en mélanges.

5

**Exemple 10 :**

On procède comme décrit dans les exemples précédents mais les acides gras qui sont placés à réagir sur les protéines sont sous formes d'esters, et la lipase utilisée réalise une réaction de trans-estérification et/ou de trans-acylation. Ainsi, le linoléate d'éthyle, l'oléate d'isopropyle et le linolénate de glycérol ainsi que différentes huiles végétales sous forme de triglycérides (dont l'huile de coprah) ont été utilisés pour fournir la chaîne grasse qui va ensuite venir se greffer sur la protéine.

15 **Exemple 11 :**

On procède comme décrit dans les exemples 1 à 9 mais les acides gras qui sont placés à réagir sur les protéines sont sous une forme réactive, du type halogénure d'acide ou anhydride d'acide. Dans ce cas, la réaction peut être effectuée dans l'eau, à température ambiante et ne nécessite pas de lipase. De telles réactions sont explicitement décrites aux exemples 17 et 18.

20 **Exemple 12 :**

On procède comme décrit dans les exemples 1 à 8 mais les chaînes grasses qui sont placées à réagir sur les protéines sont sous une forme alcool (formation de liaisons esters avec les fonctions acide carboxylique de la protéine) ou sous une forme amine (formation de liaisons amides avec les fonctions acide carboxylique de la protéine). De telles réactions sont explicitement décrites aux exemples 14 et 16 ci-après.

30 **Exemple 13 :**

On procède comme décrit dans les exemples 2 à 12 mais sans utiliser de solvant.

**Exemple 14 :****Préparation d'un complexe protéine de soja-décylalcool (C10)**

300 g de décylalcool, de pureté supérieure à 90 %, sont chauffés jusqu'à 60°C, en présence de 670 ml de tertibutanol dans un réacteur sous azote.

- 5 Après fusion des chaînes de décylalcool et obtention d'une huile incolore, 100 g d'un isolat de soja commercial, contenant au minimum 96 % de protéines natives, sont alors ajoutés en pluie fine dans le réacteur sous agitation mécanique modérée.

- Après obtention d'une suspension homogène, 30 g de lipase extraite à partir de *Rhizopus arrhizus* sont ajoutés au réacteur. L'ensemble est conservé  
10 10 jours à 60°C dans un réacteur clos sous agitation mécanique modérée.

Après 10 jours de réaction, le complexe est porté à 90°C pendant 20 min afin d'inactiver toute activité enzymatique résiduelle. Le tertibutanol est alors éliminé par distillation sous pression réduite. Le complexe ainsi obtenu est mis sous forme de copeaux lors de son refroidissement.

- 15 Après analyses, il s'avère que ce complexe est constitué de protéines lipophilisées par des chaînes grasses, et environ 12 % des alcools gras ont été couplés à la protéine (à l'aide de liaisons covalentes comme des fonctions esters, mais également à l'aide de fonctions ioniques).

- Ce complexe se présente sous la forme d'une poudre de copeaux de  
20 couleur beige, d'odeur caractéristique. Il peut être utilisé dans une formulation cosmétique à 3 %, et grâce à l'amphiphilicité apportée par le greffage, il est possible de l'incorporer dans les phases aqueuse et/ou huileuse d'une préparation cosmétique.

25 **Exemple 15 :**

- On procède comme décrit dans les exemples précédents mais les complexes formés sont dispersés en phase aqueuse et leur pH est ajusté de façon à être compatible avec des formulations cosmétiques, à l'aide d'une base minérale ou organique. Les complexes ainsi obtenus peuvent ensuite être séchés par  
30 atomisation, lyophilisation ou séchage sous vide.

**Exemple 16 :****Préparation d'un complexe protéine de soja-laurylamine (C12)**

- 300 g de laurylamine, de pureté supérieure à 90 %, sont chauffés  
35 jusqu'à 60°C, en présence de 670 ml de tertibutanol dans un réacteur sous azote. Après fusion des chaînes de laurylamine et obtention d'une huile jaunâtre, 100 g

d'un isolat de soja commercial, contenant au minimum 96 % de protéines natives, sont alors ajoutés en pluie fine dans le réacteur sous agitation mécanique modérée.

Après obtention d'une suspension homogène, 30 g de lipase extraite à partir de *Rhizopus arrizus* sont ajoutés au réacteur. L'ensemble est conservé  
5 10 jours à 60°C dans un réacteur clos sous agitation mécanique modérée.

Après 10 jours de réaction, le complexe est porté à 90°C pendant 20 min afin d'inactiver toute activité enzymatique résiduelle. Le tertibutanol est alors éliminé par distillation sous pression réduite. 4 000 ml d'eau sont alors ajoutés au complexe et l'ensemble est porté à 70°C sous agitation modérée ; puis  
10 environ 1,5 moles de HCl (sous forme de solution 6N) sont ajoutées lentement au mélange réactionnel de façon à obtenir un pH compris entre 5,0 et 7,0. Le complexe ainsi obtenu est ensuite séché par lyophilisation.

Après analyses, il s'avère que ce complexe est constitué de protéines lipophilisées par des chaînes grasses, et environ 11 % des amines grasses ont été  
15 couplées à la protéine (à l'aide de liaisons covalentes comme des fonctions amides, mais également à l'aide de fonctions ioniques).

Ce complexe se présente sous la forme d'une poudre fine de couleur beige, d'odeur caractéristique. Il peut être utilisé dans une formulation cosmétique à 3 %, et grâce à l'amphiphilicité apportée par le greffage, il est possible de  
20 l'incorporer dans les phases aqueuse et/ou huileuse d'une préparation cosmétique.

#### Exemple 17 :

##### Préparation d'un complexe protéine de blé-acides stéarique (C18) et palmitique (C16)

25 100 g de protéine de blé soluble et de haut poids moléculaire (100 000 D) extraite du gluten de blé sont placés dans 5 000 ml d'eau déminéralisée. Le milieu réactionnel est ajusté à pH 11 par une solution d'hydroxyde de sodium (NaOH, 12N). Sous très forte agitation type Ultraturrax ou Silverson (10 000 à 20 000 rpm), 300 g d'un mélange de chlorures d'acides  
30 stéarique et palmitique sont alors lentement ajoutés. Le pH passe en quelques dizaines de minutes d'une valeur de 11 à une valeur proche de 1, lorsqu'aucun tampon n'est ajouté au milieu réactionnel. Après un temps de réaction d'une heure environ à température ambiante, l'ensemble est neutralisé jusqu'à un pH voisin de 7,0 par une solution d'hydroxyde de sodium (NaOH, 12N). L'ensemble est alors  
35 lyophilisé puis éventuellement stérilisé par rayons gamma ou bêta. Le produit se présente sous la forme d'une poudre pulvérulente blanche, qui peut aussi bien être



placée dans les phases aqueuses que dans les phases huileuses de préparations, cosmétiques par exemple. Une partie des acides gras a réagi avec la protéine pour former des liaisons amides et esters, et une partie qui n'a pas réagi se trouve toutefois sous forme étroitement complexée par des liaisons hydrogènes et par des liaisons de type Van der Waals, à la protéine.

**Exemple 18 :**

**Préparation d'un complexe polypeptide d'amande-acides stéarique (C18) et palmitique (C16)**

On met en oeuvre la même technique de greffage que dans l'exemple 17 ci-dessus, mais un polypeptide d'amande, de masse moléculaire moyenne voisine de 5 000 D est utilisé à la place de la protéine de blé. La réaction est effectuée en régulant le pH à 11 par ajout de carbonate de sodium. Le complexe issu de ce greffage est conservé sous forme liquide et renferme 5 % de matière sèche ; 0,2 % de parabènes et 0,5 % de gomme de xanthane sont alors ajoutés. Le complexe ainsi formé est commercialisé sous la forme de cette solution ainsi décrite.

**Exemple 19 :**

On procède comme décrit dans les exemples 17 et 18 mais en opérant à des températures comprises entre 20 et 100°C. Les réactions de greffage réalisées à très hautes températures donnent des rendements plus importants mais donnent lieu à des dégradations modérées à sévères des protéines utilisées.

**Exemple 20 :**

**Préparation d'un complexe polypeptide d'avoine-hexadécylamine (C16)**

80 g de polypeptides d'avoine de masse moléculaire moyenne égale à 5 000 D sont placées dans 4 000 ml d'eau déminéralisée. Le milieu est neutralisé à pH 7,0. Une quantité suffisante de tampon phosphate est ajoutée de manière à obtenir un tampon phosphate 0,5 M dans le milieu réactionnel. 1 mole d'un carbodiimide comme par exemple 190 g de chlorhydrate de N-(diméthylamino-3-propyl)-N'-éthylcarbodiimide est alors ajoutée au mélange sous agitation ; 240 g de 1-hexadécylamine préalablement placée en suspension dans 2 000 ml d'eau portée à 80°C sont alors ajoutés au mélange réactionnel sous agitation mécanique très puissante (type Ultraturrax, 10 000 à 20 000 rpm). L'ensemble est conservé sous agitation 1 h à température ambiante ou 24 h à 6°C, puis est ajusté à

un pH de 7,0. Il est ensuite éventuellement dialysé contre de l'eau distillée pendant 48 h à 6°C, éventuellement séché par lyophilisation, puis éventuellement stérilisé aux rayons bêta ou gamma.

La liaison convalente qui résulte de cette réaction fournit des liaisons amides, mais d'autres liaisons caractéristiques sont présentes entre l'amine grasse et le polypeptide, comme des liaisons ioniques et des liaisons de type Van der Waals.

#### Tolérance et toxicité :

Des études d'irritation cutanée et oculaire (réalisées selon des protocoles en accord avec les directives OCDE N° 404 (12 mai 1981) et N° 405 (24 février 1987), ont été réalisées avec plusieurs des produits obtenus selon les exemples ci-dessus (exemples 1 à 20) sous forme de solutions à 10 %. Dans tous les cas, les produits sont apparus comme "non irritants" (n'ont provoqué aucun signe d'irritation cutanée ou oculaire), et ont été extrêmement bien tolérés.

De même, l'administration par voie orale de doses maximales de 5 g de ces produits par kilogramme de poids corporel n'a provoqué aucune toxicité (tests effectués selon un protocole en accord avec la ligne directrice de l'OCDE concernant l'étude de la toxicité par voie orale (N° 401 (24 février 1987))).

Par ailleurs, des tests de sensibilisation selon le protocole de Magnusson et Kligman ont été réalisés avec ces produits en solution dans l'eau à 10 % et ces produits ont été classés parmi les produits ne possédant pas de propriété sensibilisante.

#### Exemple 21 :

##### Formulation anti-âge, restructurante CC591

Phase	Produits	Noms INCI	Quantités (%)
A	Brij 72	Steareth 2	3
	Brij 721	Steareth 21	2
	Isostéaryl Isostéarate	Isostearyl Isostearate	4
	Huile de noyaux d'abricot	Apricot Kernel Oil	4
	Huile de safran	Safflower Oil	2
	Diméthicone 556	Dimethicone 556	2
	Crodacol CS50	Cetostearyl Alcool	3

B	Eau	Water	qsp 100
	Glycérine	Glycerin	5
	Produit de l'invention préparé selon l'exemple 2		6
C	Phénonip®	Phenoxyethanol	0,5
		Methylparaben	
		Ethylparaben	
		Propylparaben	
		Butylparaben	
D	Propylène glycol	Propylene Glycol	0,5
	Parfum		0,3
	Alpha tocophérol	Alpha Tocopherol	0,05

On chauffe séparément les phases A et B à 75°C, sous agitation modérée. On ajuste le pH de la phase B à la valeur de pH souhaitée. On verse A dans B sous agitation très violente (du type Silverson ou Ultraturrax), puis on

5 laisse chuter la température sous agitation lente. A 30°C, on rajoute les composants des phases C et D.

### Exemple 22 :

#### Formulation anti-âge, visage CC585

10

Phase	Produits	Noms INCI	Quantités (%)
A	Isostéaryl Isostéarate	Isostearyl Isostearate	4
	Huile de Carthame	Safflower Oil	4
	Cétiol J600	Oleyl Erucate	2
	Diméthicone 556	Dimethicone	5
	Crodacol CS50	Cetostearyl Alcool	3
	Produit de l'invention réalisé selon l'exemple 17 :		3
B	Glycérine	Glycerin	5
	Eau	Water	qsp 100
C	Phénonip®	Phenoxyethanol	0,5
		Methylparaben	
		Ethylparaben	
		Propylparaben	
		Butylparaben	
	Propylène glycol	Propylene Glycol	0,5
D	Parfum	Perfume	0,3

On chauffe séparément les phases A et B à 75°C, sous agitation modérée. Le pH de la formule est conditionné dans ce cas par le pH du produit de l'invention. On verse A dans B sous agitation très violente (du type Silverson ou Ultraturrax), puis on laisse chuter la température sous agitation lente. A 30°C, on rajoute les composants des phases C et D. Si nécessaire, on ajuste la préparation au pH désiré, à l'aide d'acide lactique par exemple.

### Exemple 23 :

#### Formulation peaux sèches, visage

10

Phase	Produits	Noms INCI	Quantités (%)
A	Huile de bourrache	Borrage Oil	2
	Huile de Carthame	Safflower Oil	4
	Myritol 318	Caprylic/Capric triglyceride	6
	Crodacol CS50	Cetostearyl Alcool	3
B	Glycérine	Glycerin	5
	Eau	Water	qsp 100
	Produit de l'invention selon l'exemple 2		4
C	Phénonip®	Phenoxyethanol	0,5
		Methylparaben	
		Ethylparaben	
		Propylparaben	
		Butylparaben	
	Propylène glycol	Propylene Glycol	0,5
D	Parfum	Perfume	0,3

On chauffe séparément les phases A et B à 75°C, sous agitation modérée. Le pH de la phase B est ajusté au pH de la formulation désiré. On verse A dans B sous agitation très violente (du type Silverson ou Ultraturrax), puis on laisse chuter la température sous agitation lente. A 30°C, on rajoute les composants des phases C et D. Si nécessaire, on ajuste la préparation au pH désiré, à l'aide d'acide lactique par exemple.

**Exemple 24 :****Formulation shampooing familial**

Phase	Produits	Noms INCI	Quantités (%)
A	Texapon N40 <sup>®</sup> (Henkel)	Sodium Laureth Sulfate	40
	Comperlan KD <sup>®</sup> (Henkel)	Cocamide DEA	2
B	Produit de l'invention selon l'exemple 17		0,3
	Eau	Water	qsp 100
	Chlorure de sodium	Sodium Chloride	1,5
C	Phénonip <sup>®</sup>	Phenoxyethanol	0,5
		Methylparaben	
		Ethylparaben	
		Propylparaben	
		Butylparaben	
	Propylène glycol	Propylene Glycol	0,5

- 5 On chauffe séparément la phase B à 75°C, sous agitation modérée. Le pH de ladite phase B est ajusté au pH de la formulation désiré. On verse B, dans A à 20°C, sous agitation très lente puis on laisse chuter la température. A 30°C, on rajoute la phase C.

10 **Exemple 25 :****Formulation shampooing doux**

Phase	Produits	Noms INCI	Quantités (%)
A	Tween 20 <sup>®</sup> (ICI)	Polysorbate 20	10
	TegoBetaine L7 <sup>®</sup> (Goldschmidt)	Cocamidopropyl Betaine	10
	Atlas G1821 <sup>®</sup> (ICI)	PEG-150 Distearate	3
B	Produit de l'invention selon l'exemple 18		0,5
	Eau	Water	qsp 100
C	Phénonip <sup>®</sup>	Phenoxyethanol	0,5
		Methylparaben	
		Ethylparaben	
		Propylparaben	
		Butylparaben	
	Propylène glycol	Propylene Glycol	0,5

On chauffe séparément la phase B à 75°C, sous agitation modérée. Le pH de ladite phase B est ajusté au pH de la formulation désiré. On homogénéise A sous agitation à 20°C. On verse B, dans A à 20°C, sous agitation très lente puis on laisse chuter la température. A 30°C, on rajoute la phase C.

5

**Exemple 26 :**

**Formulation shampooining nacré**

Phase	Produits	Noms INCI	Quantités (%)
A	Texapon N40® (Henkel)	Sodium Laureth Sulfate	40
	Comperlan KD® (Henkel)	Cocamide DEA	2
	Euperlan PK771® (Henkel)	Glycol Distearate (and)	4
		Sodium Laureth Sulfate (and) Cocamide MEA (and) Laureth-10	
B	Produit de l'invention selon l'exemple 16		0,5
	Eau	Water	qsp 100
	Chlorure de sodium	Sodium Chloride	1,5
C	Phénonip®	Phenoxyethanol	0,5
		Methylparaben	
		Ethylparaben	
		Propylparaben	
		Butylparaben	
	Propylène glycol	Propylene Glycol	0,5

10 On chauffe séparément la phase B à 75°C, sous agitation modérée. Le pH de la phase B est ajusté au pH de la formulation désiré. On homogénéise B à 20°C. On verse B, dans A à 20°C, sous agitation très lente puis on laisse chuter la température. A 30°C, on rajoute la phase C.

15 **Exemple 27 :**

**Utilisation d'un complexe protéine de blé-acides stéarique et palmitique dans des applications cosmétiques "restructurantes" et permettant de lutter contre les effets du vieillissement**

20 Les complexes réalisés selon les exemples 3 (par voie enzymatique) et 17 (par voie chimique) ont été testés pour leur capacité à lisser le micro-relief cutané. En effet, l'aspect extérieur de la peau est révélateur de son état général, et

les mailles formées par le réseau micro-dépressionnaire cutané ont tendance à s'agrandir et à se creuser au cours du vieillissement. D'autres facteurs extérieurs peuvent également contribuer à ce phénomène, comme par exemple l'utilisation de détergents. Cette désorganisation du micro-relief est le signe d'une altération de la couche cornée et de sa fonction de barrière protectrice naturelle. Elle donne un aspect rugueux et un toucher rêche au tégument, puis conduit à une déshydratation prononcée de celui-ci.

L'activité restructurante de ces complexes a été étudiée après une destruction importante du réseau micro-dépressionnaire, obtenue par une agression chimique du revêtement cutané à l'aide d'une solution aqueuse contenant 10 % de détergent (lauryl sulfate de sodium). Les essais ont été réalisés sur la face externe des deux mains de 10 volontaires. Chaque main a été lavée 4 fois par jour pendant 30 secondes, à 1/2 h d'intervalle, pendant 4 jours avec cette solution de détergent. Une des mains a reçu à l'issue de ces traitements, chaque jour, un traitement réalisé à partir d'une solution contenant 3 % du complexe réalisé selon l'exemple 3 ou 17 de l'invention. Chaque jour, la réparation cutanée a été évaluée comparativement aux zones témoins, agressées et non traitées, par observation directe de la surface cutanée au stéréo-microscope, et par étude des stripping. L'efficacité du complexe a été comparée à celle de la protéine de blé utilisée pour la réalisation dudit complexe ; les pouvoirs filmogènes et adoucissants de la protéine de blé étant bien connus.

Les deux produits (protéine et protéine complexée) améliorent nettement et d'une façon quasi-évidente l'aspect visuel de la surface cornée ; cependant, seul le complexe protéine de blé-acides gras selon l'invention, présente un pouvoir restructurant extrêmement important (voisin de 90 %), qui ne se limite pas à freiner l'agression due au détergent, mais qui permet une régénération de l'ensemble du tégument. Ainsi, les peaux traitées sont fréquemment en meilleur état après dégradation et application de la solution aqueuse du complexe préparé à l'exemple 3 ou 17, qu'avant tout traitement.

Ainsi, il est possible d'affirmer que le complexe protéine de blé-chaînes palmitique et stéarique est un actif cosmétique "régénérant", capable d'équilibrer et d'harmoniser la cohésion de l'épiderme.

**Exemple 28 :****Utilisation d'un complexe polypeptide d'amande-acides stéarique et palmitique dans des applications cosmétiques permettant d'apaiser les agressions cutanées liées aux érythèmes solaires**

5 Les complexes réalisés selon les exemples 4 (par voie enzymatique) et 18 (par voie chimique) ont été testés pour leur capacité à réduire et calmer les érythèmes solaires ; en effet, les coups de soleil répétés favorisent d'une part une altération des mécanismes biochimiques de la peau, par la destruction des lipides des membranes cellulaires, par la fragmentation des macromolécules biologiques  
10 indispensables aux réparations cutanées, et d'autre part l'accélération du vieillissement cutané ; la conjonction de ces deux phénomènes pouvant parfois se traduire par l'apparition de cancers cutanés.

Le pouvoir anti-érythémateux du complexe polypeptide d'amande-acides stéarique et palmitique a été étudié chez le cobaye dont la réaction  
15 érythémale est bien corrélée à celle de l'homme. Les irradiations des animaux ont été réalisées à l'aide de 2 lampes Philipps TL 40W/12 émettant entre 280 et 340 nm avec un pic à 315 nm. Placé à 3 % au sein d'une émulsion (voir composition A ci-dessous), le complexe réalisé selon l'exemple 4 ou 18 a été testé comparativement à une émulsion placebo (voir composition C ci-dessous) et à une émulsion  
20 contenant le polypeptide d'amande utilisé dans le complexe, sous forme non complexé (voir composition B ci-dessous). Dans chaque cas, 0,25 ml de produit a été administré immédiatement après irradiation, puis 2, 5 et 24 h après l'exposition. L'érythème étant évalué selon une cotation visuelle de 0 (pas d'érythème) à 4 (érythème intense), l'effet réducteur d'érythème a été mesuré 2, 5, 24 et 48 h après  
25 l'irradiation, comparativement aux zones témoins irradiées mais non traitées. Les résultats ont ensuite été exprimés en pourcentage d'inhibition de l'érythème.

Phase	Ingrédients	A	B	C
A	Complexe décrit dans l'exemple 4 ou 18	3	0	0
	Polypeptide d'amande	0	0,75	0
	Eau	qsp 100	qsp 100	qsp 100
B	Huile de noyaux d'abricot	5	5	5
	Isostéaryl d'isostéarate	5	5	5
	Erucate d'oléyle	2	2	2
	Alcool cétostéarylique	3	3	3



C	Huile de silicone	2	2	2
	Parabènes	0,2	0,2	0,2

Préparation des compositions : Les phases A et B sont chauffées séparément à 75°C. Après une bonne homogénéisation, B est versé dans A sous agitation très intense, puis l'ensemble est porté à refroidir sous agitation lente. A 30°C, la phase C est alors ajoutée.

Résultats : Des érythèmes modérés ont été réalisés sur les cobayes. Ils correspondent à des érythèmes d'indice 1,5 à 24 h. L'effet adoucissant procuré par l'application d'une émulsion cosmétique de l'art antérieur (préparation placebo C) sur ces érythèmes, bien que sensible, reste insuffisant pour combattre efficacement le développement de la réaction inflammatoire. Par contre, le pouvoir anti-érythémateux du complexe (préparation A) est immédiat (inhibition de l'érythème d'environ 30 %, 2 h après l'application) et durable tout au long des traitements (inhibition de 45 %, 45 % et 65 % après respectivement 5, 24 et 48 h). La préparation réalisée avec le polypeptide d'amande non complexé (préparation B) ne permet pas non plus d'obtenir de tels résultats.

D'autres résultats ont été obtenus sur des érythèmes provoqués beaucoup plus prononcés (érythèmes d'indice 2 à 24 h). Dans ce cas, l'efficacité de la préparation A est encore plus prononcée par rapport aux efficacité obtenues avec les autres préparations.

Il est donc possible d'affirmer que le complexe polypeptide d'amande-chânes stéarique et palmitique, utilisé dans une formulation cosmétique, est un actif qui permet de réparer durablement les effets destructeurs des érythèmes solaires modérés voire forts, observés lors d'expositions solaires prolongées.

- Revendications -

1. Complexe amphiphile résultant de la réaction, à une température comprise entre la température ambiante et 80°C, entre d'une part une (ou plusieurs)  
5 protéine(s) et/ou un (ou plusieurs) polypeptide(s), dont la masse moléculaire moyenne est supérieure ou égale à 2 000 Daltons et d'autre part, une (ou plusieurs) chaîne(s) grasse(s) dont le nombre d'atomes de carbone est compris entre 4 et 30 choisie(s) parmi les acides gras, les alcools gras, les amines grasses et leurs dérivés à l'exclusion de l'acide undécylénique ; le rapport pondéral des réactifs [protéine(s)  
10 et/ou polypeptide(s)]/[chaîne(s) grasse(s)] variant de 1/1 à 1/10 et avantageusement de 1/3 à 1/5.

2. Complexe selon la revendication 1, caractérisé en ce que la protéine et/ou le polypeptide a une masse moléculaire moyenne comprise entre 2 000 et 1 000 000 Daltons, avantageusement entre 5 000 et 300 000 Daltons.

15 3. Complexe selon l'une des revendications 1 ou 2, caractérisé en ce que la chaîne grasse a un nombre d'atomes de carbone compris entre 6 et 20.

4. Complexe selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisé en ce qu'il consiste en le produit de ladite réaction en mélange avec les chaînes grasses n'ayant pas réagi.

20 5. Complexe selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que la protéine et/ou le polypeptide est d'origine animale ou végétale et est avantageusement choisi parmi le collagène, la gélatine, l'albumine, l'ovalbumine, l'élastine, la réticuline, la fibronectine, la kératine, la soie, la laminine, la desmosine, l'isodesmosine, les protéoglycannes de la matrice extra-cellulaire, les  
25 caséines, la lactalbumine, les lactoglobulines, les enzymes, les protéines ou hydrolysats modérés de blé, de maïs, de coton, de lupin, de pois, de fève, d'amande, de féverole, de soja, de tournesol, de luzerne, d'avoine.

6. Complexe selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, caractérisé en ce que la chaîne grasse est choisie parmi les acides gras heptanoïque, octanoïque, décanoïque, laurique, myristique, palmitique, stéarique, ricinoléique, oléique, linoléique, linolénique; les alcools gras et amines grasses correspondants; les dérivés desdits acides gras, alcools et amines ; et leurs mélanges.

7. Composition, notamment cosmétique, pharmaceutique ou alimentaire, renfermant à titre d'ingrédient actif au moins une protéine et/ou un polypeptide,  
35 caractérisée en ce qu'elle renferme, au moins en partie, ladite protéine et/ou ledit

polypeptide sous la forme d'un complexe selon l'une quelconque des revendications précédentes.

5 8. Procédé de préparation d'un complexe amphiphile selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, caractérisé en ce qu'il comprend la réaction dite de couplage, à une température comprise entre la température ambiante et 80°C, si nécessaire en milieu aqueux ou solvant, entre au moins une protéine et/ou un polypeptide du type précité et au moins une chaîne grasse du type précité ; le rapport pondéral des réactifs [protéine(s) et/ou polypeptide(s)]/[chaîne(s) grasse(s)] variant de 1/1 à 1/10 et avantageusement de 1/3 à 1/5.

10 9. Procédé selon la revendication 8, caractérisé en ce que, après ladite réaction, les complexes formés sont dispersés en phase aqueuse pour un ajustement de leur pH et éventuellement ensuite séchés.

15 10. Procédé selon l'une des revendications 8 ou 9, caractérisé en ce que les protéine(s) et/ou polypeptide(s) et chaîne(s) grasse(s) sont couplés par voie chimique en présence d'agents bifonctionnels couramment utilisés dans la synthèse peptidique ou en faisant intervenir les acides gras sous une forme réactive.

20 11. Procédé selon l'une des revendications 8 ou 9, caractérisé en ce que les protéine(s) et/ou polypeptide(s) et chaîne(s) grasse(s) sont couplés par voie enzymatique; les acides gras intervenant éventuellement sous forme d'esters (y compris d'esters de glycérides).

12. Procédé selon la revendication 11, caractérisé en ce que ledit couplage enzymatique est mis en oeuvre à une température comprise entre 30 et 70°C, avantageusement entre 50 et 60°C.

25 13. Procédé selon l'une des revendications 11 ou 12, caractérisé en ce que ledit couplage enzymatique est mis en oeuvre avec une acyltransférase ; avantageusement une lipase, telle une lipase de *Mucor miehei*, de pancréas de porc, de *Rhizopus arrhizus*, de *Candida*, de *Bacillus* ou d'*Aspergillus* ou avantageusement une protéase telle la papaïne ou avantageusement une amidase.

30 14. Procédé selon l'une quelconque des revendications 11 à 13, caractérisé en ce que l'activité de l'eau ( $a_w$ ) du milieu réactionnel est comprise entre 0,2 et 1 et avantageusement comprise entre 0,3 et 0,7.

# RAPPORT DE RECHERCHE

articles L.612-14, L.612-17 et R.612-53 à 69 du code de la propriété intellectuelle

## OBJET DU RAPPORT DE RECHERCHE

---

Après l'accomplissement de la procédure prévue par les textes rappelés ci-dessus, le brevet est délivré. L'Institut National de la Propriété Industrielle n'est pas habilité, sauf dans le cas d'absence **manifeste** de nouveauté, à en refuser la délivrance. La validité d'un brevet relève exclusivement de l'appréciation des tribunaux.

L'I.N.P.I. doit toutefois annexer à chaque brevet un "RAPPORT DE RECHERCHE" citant les éléments de l'état de la technique qui peuvent être pris en considération pour apprécier la brevetabilité de l'invention. Ce rapport porte sur les revendications figurant au brevet qui définissent l'objet de l'invention et délimitent l'étendue de la protection.

Après délivrance, l'I.N.P.I. peut, à la requête de toute personne intéressée, formuler un "AVIS DOCUMENTAIRE" sur la base des documents cités dans ce rapport de recherche et de tout autre document que le requérant souhaite voir prendre en considération.

## CONDITIONS D'ÉTABLISSEMENT DU PRÉSENT RAPPORT DE RECHERCHE

---

- ☒ Le demandeur a présenté des observations en réponse au rapport de recherche préliminaire.
- ☐ Le demandeur a maintenu les revendications.
- ☒ Le demandeur a modifié les revendications.
- ☐ Le demandeur a modifié la description pour en éliminer les éléments qui n'étaient plus en concordance avec les nouvelles revendications.
- ☐ Les tiers ont présenté des observations après publication du rapport de recherche préliminaire.
- ☐ Un rapport de recherche préliminaire complémentaire a été établi.

## DOCUMENTS CITÉS DANS LE PRÉSENT RAPPORT DE RECHERCHE

---

La répartition des documents entre les rubriques 1, 2 et 3 tient compte, le cas échéant, des revendications déposées en dernier lieu et/ou des observations présentées.

- ☒ Les documents énumérés à la rubrique 1 ci-après sont susceptibles d'être pris en considération pour apprécier la brevetabilité de l'invention.
- ☒ Les documents énumérés à la rubrique 2 ci-après illustrent l'arrière-plan technologique général.
- ☐ Les documents énumérés à la rubrique 3 ci-après ont été cités en cours de procédure, mais leur pertinence dépend de la validité des priorités revendiquées.
- ☐ Aucun document n'a été cité en cours de procédure.

1. ELEMENTS DE L'ETAT DE LA TECHNIQUE SUSCEPTIBLES D'ETRE PRIS EN CONSIDERATION POUR APPRECIER LA BREVETABILITE DE L'INVENTION	
Référence des documents (avec indication, le cas échéant, des parties pertinentes)	Revendications du brevet concernées
EP-A-0 417 619 (HOECHST) * le document en entier *	1-14
DE-A-34 22 496 (JENTSCH G. ) * page 11 - page 12 * * page 1 - page 5 *	1,7,8
EP-A-0 283 601 (POLYDEX PHARMACEUTICALS LIMITED) * le document en entier *	1,7,8
2. ELEMENTS DE L'ETAT DE LA TECHNIQUE ILLUSTRANT L'ARRIERE-PLAN TECHNOLOGIQUE GENERAL	
WO-A-93 22370 (COLETICA)	
US-A-4 234 475 (SOKOL P. E. )	
WO-A-92 13006 (COLETICA)	
3. ELEMENTS DE L'ETAT DE LA TECHNIQUE DONT LA PERTINENCE DEPEND DE LA VALIDITE DES PRIORITES	
Référence des documents (avec indication, le cas échéant, des parties pertinentes)	Revendications du brevet concernées
NEANT	